

正交设计联用星点设计-效应面法优化 染料木素胶束制备工艺

何礼¹, 韩瑞伟¹, 唐晓飞², 张悦¹, 王丽丽¹, 郭欣¹, 阎雪莹^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨市香坊区疾病预防控制中心, 哈尔滨 150031)

[摘要] 目的: 优化改良的自乳化溶剂挥发法制备染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备工艺。方法: 先采用正交设计进行处方的初步筛选, 确定主要影响因素。再采用星点设计-效应面法进一步优化处方, 以染料木素在有机相中浓度、MePEG-PLGA 在有机相中浓度、水相和油相体积比为考察因素, 以包封率、载药量和平均粒径为考察指标, 对结果进行多元线性回归及二项式拟合, 经效应面法预测较佳工艺条件。结果: 正交设计和星点设计-效应面法联用后得到的优化处方制备的样品包封率为 84.43%, 载药量为 2.63%, 平均粒径为 63.7 nm。结论: 正交设计联用星点设计-效应面法可以准确快速的优化染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备工艺, 所建立的数学模型具有较好的预测能力。

[关键词] 染料木素; 胶束; 正交设计; 星点设计-效应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0012-05

Optimization Preparation Technology of Genistein Micelles by Orthogonal Design and Central Composite Design-response Surface Methodology

HE Li¹, HAN Rui-wei¹, TANG Xiao-fei², ZHANG Yue¹, WANG Li-li¹, GUO Xin¹, YAN Xue-ying^{1*}

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Xiangfang Center for Disease Control and Prevention of Harbin, Harbin 150031, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of genistein-loaded MePEG-PLGA nano-micelle with modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **Method:** Firstly, orthogonal design was used to preliminary screen prescription, and determine main influence factors. Then optimized prescription by central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). Main influence factors included concentration of genistein micelles in organic phase, concentration of MePEG-PLGA in organic phase and the ratio of water phase to organic phase, evaluation parameters included entrapment efficiency, drug loading and average diameter. Data were simulated using multi-linear regression and second-order polynomial equation. The better technology condition was predicted by response surface method. **Result:** According to the optimal formulation, the entrapment efficiency, the drug loading and the average diameter of the prepared nano-micelle were 84.43%, 2.63%, 63.7 nm, respectively. **Conclusion:** Combined of orthogonal design with CCD and RSM was a convenient and feasible method to optimize preparation technology of genistein-loaded MePEG-PLGA nano-micelle and model developed in this study are proved to be predictable.

[Key words] genistein; nano-micelle; orthogonal design; central composite design-response surface methodology

[收稿日期] 20110717(001)

[基金项目] 黑龙江省教育厅研究生创新科研项目(YJSCX2011-459HLJ)

[第一作者] 何礼, 硕士, 从事靶向制剂研究, Tel: 0451-82195748, E-mail: heli_stu@126.com

[通讯作者] * 阎雪莹, 教授, 硕士生导师, 从事靶向制剂及天然药效成分的体内代谢研究, Tel: 0451-82195748, E-mail: yanxuey@yahoo.com.cn

聚合物胶束是一种由两亲嵌段共聚物在适当条件下自发形成的核-壳纳米载体^[1]。由于其抗血液稀释能力突出、具备长循环特性、能极大程度增加难溶性药物溶解度且对药物具有缓控释作用、对肿瘤部位渗透能力强等独特优势,在近10年来受到了广泛的关注。

染料木素(genistein, GEN)是从豆科植物槐角 *Sophora japonica* L. 中提取得到的一种异黄酮类化合物。大量研究证实 GEN 具有雌激素作用、抗氧化作用以及抑制拓扑异构酶活性、抑制蛋白酪氨酸激酶活性、诱发细胞程序性死亡、抑制血管生成等作用^[2],已有多个制剂上市或进入临床试验,是一种很有潜力的癌症化学预防剂和治疗剂。然而 GEN 在水中几乎不溶,直接口服生物利用度低,限制了其临床应用。本实验以具有很好生物相容性和应用安全性的 MePEG-PLGA 为载体制备 GEN 共聚物胶束,以提高药物生物利用度,并增加其靶向性,提高疗效。

星点设计^[3]是在 2 水平析因设计的基础上加上中心点和星点构成,本课题基于正交设计和星点设计的特点,将 2 种设计方法联用并以此来优化染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备工艺,探讨 2 种设计方法联用的科学性和有效性。

1 材料

TECNAIG2 型透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司),Mastersizer 2000 型激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司),LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),BT25S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

GEN 对照品(含量 $\geq 98\%$,批号 111704-200501,中国药品生物制品检定所),GEN(含量 98.19%,批号 XC100310,西安小草植物科技有限责任公司),MePEG-PLGA (MePEG 相对分子质量 4 000, $m_{\text{MePEG}}:m_{\text{PLGA}}=1:3$, $m_{\text{LA}}:m_{\text{GA}}=75:25$,济南岱罡生物科技有限公司),透析袋(相对分子质量:8 000~14 400,美国 Sigma 公司),Poloxamer188(德国 BASF 公司),甲醇为色谱纯,水为去离子水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 GEN 胶束的制备 采用改良的自乳化溶剂扩散法制备胶束,分别称取处方量的 GEN, MePEG-PLGA 于锥形瓶中。加入适量丙酮和乙醇的混合有

机溶剂,水浴 50 °C 使其完全溶解。在机械搅拌条件下,将所得混合溶液滴入预先配好的 P188 溶液。滴定结束后继续搅拌一段时间,将所得产物在 40 °C 下减压除去有机溶剂,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 GEN 胶束的含量和包封率测定 采用反相 HPLC 测定 GEN 含量。色谱条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 甲醇-水(60:40), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 260 nm, 进样量 10 μL 。在此色谱条件下,以 GEN 峰面积(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归,所得标准曲线方程为 $Y = 124\,316X - 38\,008$ ($R^2 = 0.999\,9$),可见 GEN 在 1.76~52.8 mg \cdot L⁻¹ 内线性关系良好。

精密移取 0.5 mL GEN 胶束于量瓶中,精密加入乙腈 4 mL,涡旋 1 min,进样 10 μL 测定胶束中的 GEN 总量。将适量的 GEN 胶束溶液装入已处理的透析袋内,透析袋浸入 50 mL 含 2% 聚氧乙烯梨醇酐单油酸酯的生理盐水中,室温下磁力搅拌 6 h,取透析外液,按上述色谱条件测定胶束中游离的 GEN 量,按下式计算包封率和载药量:包封率 = $(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}} \times 100\%$,载药量 = $(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{胶束}} \times 100\%$,式中 $m_{\text{总}}$ 为 GEN 胶束所含 GEN 总量, $m_{\text{游离}}$ 为透析外液中游离的 GEN 量, $m_{\text{胶束}}$ 为胶束中所载的 GEN 和辅料量总和。

2.3 试验设计 依据预试验结果,按 $L_8(2^7)$ 安排试验,初步考察药物在有机相中质量浓度(X_1)、载体在有机相中质量浓度(X_2)、水相和有机相体积比(X_3)、乙醇体积分散(X_4)、表面活性剂质量浓度(X_5) 5 种影响因素,以包封率(EE%)为指标,对数据进行直观分析,确定主要影响因素。因素水平见表 1,正交试验结果见表 2,方差统计分析结果见表 3。

表 1 GEN 制备工艺正交设计因素水平

水平	X_1	X_2	X_3	$X_4 / \%$	$X_5 / \%$
1	0.5	5	5:1	20	0.4
2	1	10	10:1	40	1

方差分析结果表明,因素 X_2 对试验结果有极显著影响,因素 X_1 和 X_3 对试验结果有显著影响,而因素 X_4 和 X_5 影响不显著。由于 X_4 和 X_5 为不显著因素,综合试验现象及数据结果,确定 $X_4 = 40\%$, $X_5 = 1\%$ 。

表 2 GEN 制备工艺正交试验安排及结果

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	空白列 1	空白列 2	EE/%
1	1	1	1	1	1	1	1	43.24
2	1	1	1	2	2	2	2	45.05
3	1	2	2	1	1	2	2	58.15
4	1	2	2	2	2	1	1	59.04
5	2	1	2	1	2	1	2	49.48
6	2	1	2	2	1	2	1	40.35
7	2	2	1	1	2	2	1	73.10
8	2	2	1	2	1	1	2	68.73
I_j	205.48	178.12	230.12	223.97	210.47	220.49	215.73	
II_j	231.66	259.02	207.02	213.17	226.67	216.65	221.41	
R_j	26.18	80.90	23.10	10.80	16.20	3.84	-5.68	
SS_j	85.67	818.10	66.70	14.58	32.80	1.84	4.03	

表 3 GEN 制备工艺正交试验方差统计分析

变异来源	SS	f	F	P
X_1	85.67	1	29.19	<0.05
X_2	818.10	1	278.74	<0.01
X_3	66.70	1	22.73	<0.05
X_4	14.58	1	4.97	
X_5	32.80	1	11.18	
Error	4.87	2		

根据正交试验设计筛选结果,按 3 因素 5 水平星点设计安排试验,进一步考察影响处方配比的主要因素 X_1, X_2, X_3 对包封率(Y_1)、载药量(Y_2)、粒径

(Y_3) 及归一化值(OD) 4 个评价指标的影响,依据多元非线性回归方程及效应面法确定 GEN 胶束处方的最佳配比。因素及水平表见表 4,试验安排见表 5。

表 4 3 个因素的代码水平及对应物理量

因素	-1.732	-1	0	1	1.732
X_1	0.5	1.03	1.75	2.47	3
X_2	5	10.28	17.5	24.72	30
X_3	2	5.80	11	16.20	20

表 5 星点设计(1~7 列)及效应值(8~11 列)

No.	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	OD
1	-1	-1	-1	1.03	10.28	0.18	72.54	1.25	51.10	0.592
2	1	-1	-1	2.47	10.28	0.18	36.00	1.76	70.80	0.648
3	-1	1	-1	1.03	24.72	0.18	60.89	1.36	56.40	0.638
4	1	1	-1	2.47	24.72	0.18	37.59	1.88	75.90	0.599
5	-1	-1	1	1.03	10.28	0.42	86.51	1.53	62.50	0.423
6	1	-1	1	2.47	10.28	0.42	52.08	2.21	76.40	0.538
7	-1	1	1	1.03	24.72	0.42	71.58	1.58	62.90	0.539
8	1	1	1	2.47	24.72	0.42	45.65	2.30	78.90	0.538
9	-1.732	0	0	0.5	17.5	0.3	89.64	1.03	55.70	0.417
10	1.732	0	0	3	17.5	0.3	31.81	2.25	90.10	0.452
11	0	-1.732	0	1.75	5	0.3	69.54	1.92	63.50	0.541
12	0	1.732	0	1.75	30	0.3	51.71	2.23	69.40	0.587
13	0	0	-1.732	1.75	1.75	0.1	40.78	1.48	56.80	0.727
14	0	0	1.732	1.75	1.75	0.5	59.97	1.97	67.20	0.571
15~20	0	0	0	1.75	1.75	0.3	82.68	1.77	64.90	0.445

以包封率、载药量、粒径及 OD 值作为因变量,以 SPSS 17.0 为统计软件,分别对各因素的各水平进行多元线性和二次多项式拟合,以拟合方程的回归系数 R^2 最大且 F 检验合格为原则。数学模型方程式如下:

$$\text{多元线性回归方程: } Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3$$

$$\text{二次多项式方程: } Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 +$$

$$b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{13} X_1 X_3$$

根据最优方程绘制三维效应面和二维等高线,选取优化区,并在优化区内选择代表性的处方进行验证,计算偏差。

3 试验数据

采用 SPSS 17.0 统计软件,经多元线性回归处理后,拟合所得方程为:

$OD = 0.591 + 0.019X_1 + 0.002X_2 - 0.01X_3$ ($R^2 = 0.208$, $P < 0.01$)

由 R^2 值可以看出多元线性拟和不理想,OD 值与各因素之间线性相关性较差,相关系数仅为 0.208。故进一步采用二次多项式非线性回归拟合,并经过方差分析化简方程系数,得到如下方程:

$$OD = 0.901 + 0.107 X_1 - 0.018 X_2 - 0.068 X_3 + 0.001 X_2^2 + 0.003 X_3^2 - 0.005 X_1 X_2 \quad (R^2 = 0.933, P < 0.01)$$

结果表明采用二次多项式非线性回归拟合,各相关系数为 0.933,拟合效果明显优于多元线性回归,可以作为分析及预测的模型。按照二项式拟合方程,用 SAS8.0 描绘 OD 值对两因素的三维效应面图和二维等高线图(其他 1 个自变量设为中心点值),见图 1~3。

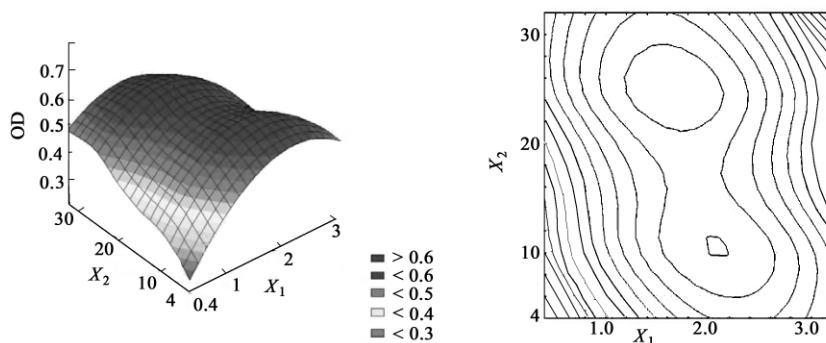


图 1 OD 值对 X_1 和 X_2 的三维图(左)和等高线(右)

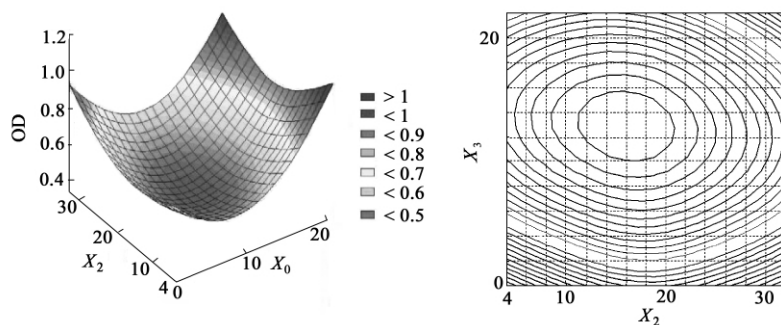


图 2 OD 值对 X_2 和 X_3 的三维图(左)和等高线(右)

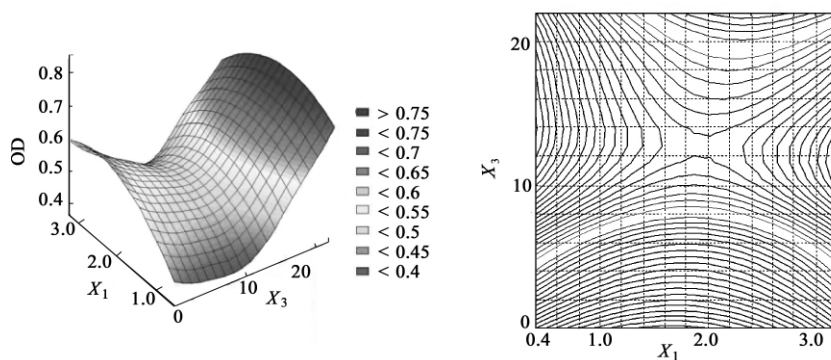


图 3 OD 值对 X_1 和 X_3 的三维图(左)和等高线(右)

从三维效应图和等高图中选取包封率和载药量较高、粒径较小及综合指标较理想的区域,得到各因素的较优范围为 X_1 2.0 ~ 2.2 $g \cdot L^{-1}$; X_2 10 ~ 12 $g \cdot L^{-1}$; X_3 1 ~ 3。根据实际操作与制剂目的,选

择 $X_1 = 2.1 g \cdot L^{-1}$, $X_2 = 11 g \cdot L^{-1}$, $X_3 = 2$ 作为最佳处方,在此条件下制备 3 批样品,各指标结果见表 6。平均粒径为 63.7 nm,粒径分布较窄(多分散指数 PDI 为 0.029); Zeta 电位为 -25.1 mV,表明胶

束比较稳定;用透射电镜观察,胶束呈球形,分别见图 4~5。

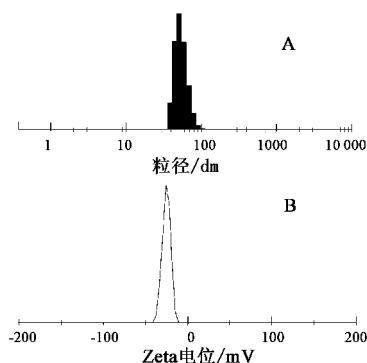


图 4 GEN 胶束的粒径分布(A)和 Zeta 电位(B)

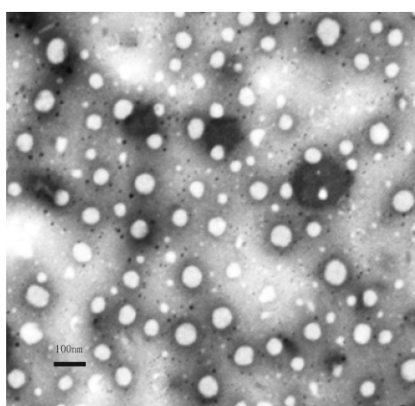


图 5 GEN 胶束的电镜照片

表 6 GEN 胶束优化处方预测值与实测值的比较 (n=3)

因变量	预测值	测得值	误差 /%
包封率 /%	81.24	84.43	3.93
载药率 /%	2.52	2.63	4.37
粒径 /nm	65.30	63.70	-2.45

从表 6 中可以看出,优化的各指标均接近或高于各试验中的最佳值,验证结果也显示各指标的预测值与实测值偏差的绝对值均 <5%,说明所建模型具有较好的预测性。

4 讨论

改善药物的溶解性,提高其生物利用度,目前使用较多的是使用混合溶剂或增溶剂等^[4],但增溶效果不理想,或是具有较大毒性。如增溶环孢素 A 和紫杉醇的聚氧乙烯蓖麻油 EL 可引起过敏、高血压症以及神经毒性等副反应^[5],常用的表面活性剂 Tween-80 可引起过敏、溶血等不良反应^[6],胆酸盐

对粘膜具有刺激性,注射时引起疼痛和溶血。聚合物胶束作为一种极具开发潜力的药物载体,基本上克服了以上缺点,紫杉醇胶束制剂 Genexol-PM 的 II 期临床研究结果显示,69 例中仅有 4 例出现了过敏反应^[7]。

本课题制备所得胶束包封率达到 80% 以上,但载药量相对偏低,其原因可能是较小的粒径限制了疏水核中包载的药量,因此有必要对其进一步的研究以获得更高包封率和载药量的 GEN 胶束。有文献报道^[8],这一问题可通过将药物与 PLGA 进行共价键结合来解决,因此本课题将进一步尝试将药物键合至 PLGA 末端的羧基上,然后再制备 GEN 胶束。

[参考文献]

- [1] Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery [J]. Prog Polym Sci, 2007, 32(8/9): 962.
- [2] 吴丽萍,李宇晟,刘艳平,等. 染料木素抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2009, 32(1): 47.
- [3] VAN Eeckhaut A, Detaevernier M R, Crommen J, et al. Influence of methanol on the enantioresolution of antihistamines with carboxymethyl-beta-cyclodextrin in capillary [J]. Electrophor 2004, 25(16): 2838.
- [4] 张波,张东娜,王洪权,等. 难溶性药物增溶技术的研究进展 [J]. 解放军药学报, 2009, 25(5): 425.
- [5] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Gremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(31): 1590.
- [6] ten Tije A J, Verweij J, Loos W J, et al. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42(7): 665.
- [7] Kim D W, Kim S Y, Kim H K, et al. Multicenter phase II trial of genexol-PM, a novel cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2007, 18(12): 2009.
- [8] Yoo H S, Park Tg. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer [J]. J Controlled Release, 2001, 70(1/2): 63.

[责任编辑 全燕]